



REF

M46 MICROGEN® CAMPYLOBACTER

50

IVD

GB

INTENDED USE

Microgen® Campylobacter is a rapid latex agglutination test intended for confirmatory identification of enteropathogenic, thermophilic campylobacters cultured on selective solid media from faecal samples from patients with suspected bacterial enteritis. The kit is intended for professional laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

Latex particles are coated with rabbit immunoglobulins raised against antigen preparations from selected *Campylobacter jejuni* serotypes. When the sensitised latex particles are mixed with a solution containing enteropathogenic Campylobacter antigens, a sensitive and specific immunochemical reaction takes place causing the finely dispersed latex particles to agglutinate into aggregates that are easily visible to the unaided eye.

CONT

KIT PRESENTATION

REAG

TEST

M46a Test Latex Reagent: 2.5mL

Latex particles coated with rabbit antibodies to Campylobacter antigens. Preserved with 0.099% sodium azide. **(Blue cap)**

REAG

CONTROL

M46b Control Latex Reagent: 2.5mL

Latex particles coated with non-specific rabbit immunoglobulins. Preserved with 0.099% sodium azide. **(Yellow cap)**

CONTROL

+

M46c Positive Control: 1.0mL

Suspension of inactivated Campylobacter antigens reactive with Test Latex Reagent and non-reactive with Control Latex Reagent. Preserved with 0.099% sodium azide. **(Black cap)**

SAMP DIL

M46d Sample Diluent: 50mL

0.85% Isotonic Saline preserved with 0.099% sodium azide. **(white cap)**

Instructions for Use

Disposable agglutination slides

Disposable mixing sticks

Additional Requirements:

- Bacteriological loops
- Campylobacter semi-selective solid agar culture plates (see below)
- Disposable plastic specimen tubes (capacity 1mL)
- Gas jars for maintaining microaerophilic culture conditions
- 42°C incubator (if not available, a 37°C incubator is acceptable)

WARNINGS AND PRECAUTIONS**Safety:**

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only
2. Sodium azide, which is used as a preservative in the kit reagents can react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Dispose by flushing with a large volume of water to prevent azide build-up.
3. Appropriate precautions should be taken when handling or disposing of potential pathogens. Decontamination of infectious material can be achieved with sodium hypochlorite at a final concentration of 3% for 30 minutes. Liquid waste containing acid must be neutralised before treatment.
4. The positive control has been inactivated during the manufacturing process. However, it should be handled as though potentially infectious.

Procedural:

1. Microgen® Campylobacter should be used according to the kit instructions.
2. Allow all reagents to reach room temperature before use.
3. Do not dilute any of the kit reagents
4. Do not intermix reagents from different batches of kits.
5. Do not freeze any of the kit reagents
6. Do not allow the latex reagent dropper to touch the positive control or bacterial samples.
7. Ensure the agglutination slide is clean and dry prior to use.

STORAGE AND SHELF LIFE

Microgen® Campylobacter should be stored at 2-8°C when not in use. The kit should not be used after the expiry date printed on the carton label.

SPECIMENS

Faecal samples should be inoculated on to blood-free selective agar plates (Modified CCDA Preston, see Appendix) at a concentration of 0.2-0.3g sample per plate. Plates should be incubated in a microaerophilic atmosphere at 42°C for 48 hours.

Colonies with morphology resembling Campylobacter are removed for testing with Microgen® Campylobacter (see below)

PROCEDURE**Quality Control:**

The following check with the Positive Control should be performed each time the kit is used to confirm that the reagents are functioning correctly:

1. A single 50µL drop of Positive Control should be dispensed on to two adjacent areas on the test slide.
2. These should be tested with the Test and Control Latex Reagents as described in "Test Procedure" below.
3. Deterioration of a reagent should be suspected if:
 - There is no reaction between the Test Latex Reagent and the Positive Control OR the reaction shows a significant loss of strength with time.
 - The Control Latex Reagent reacts with the Positive Control
 - A latex reagent becomes discoloured or forms lumps which do not disperse with gentle shaking.

Test Procedure:

1. Bring all reagents to room temperature. Gently shake the latex reagents to ensure a homogeneous suspension.
2. Dispense 50µL of Sample Diluent on to each of two ovals of the agglutination slide.
3. Use an inoculating loop to remove several colonies with Campylobacter-like morphology. If evidence of microbial growth is sparse, take a broad sweep of the agar surface. Mix the bacteria into each of the two drops of Sample Diluent on the slide to form even suspensions.
4. Add 1 drop (50µL) of Control Latex reagent to one of the bacterial suspensions on the slide. Similarly dispense 1 drop (50µL) of Test Latex reagent to the other bacterial suspension.
5. Mix the bacterial suspensions with the latex reagents using a mixing stick, **starting with the Control Latex reagent**. Spread the mixtures to the edges of the oval areas.
6. Gently rock the slide, to keep the fluid suspensions in constant movement, for 2 minutes. Observe for agglutination.
7. Read the test results (see INTERPRETATION below)
8. Discard the used mixing sticks and slides into a suitable disinfectant.

INTERPRETATION

An agglutination reaction is indicated by visible aggregation of the latex particles. The strength of the reaction may vary, and can be assessed according to the following guidelines.

- + reaction - fine, but readily discernible granularity against a milky background.
- ++ reaction - coarse granularity against a milky background.
- +++ reaction - heavy clumping of particles around the periphery of the test oval, against a clear background.

Microgen® Campylobacter results should be interpreted as follows:

Reaction with Test Latex	Reaction with Control Latex	Interpretation
+	-	Campylobacters present
-	-	Campylobacters not present in sufficient numbers to be detected by the test
+	+	Non-specific agglutination. Inconclusive result*

*A specimen that causes the Control Latex reagent to agglutinate cannot be tested by Microgen® Campylobacter.

LIMITATIONS OF USE

1. Results should be interpreted by the clinician in the context of all available clinical and laboratory information.
2. Non-specific agglutination of the Control Latex reagent does not preclude the presence of Campylobacters but the result has to be reported as inconclusive. The sample should be tested by an alternative method.
3. Very low numbers of Campylobacters may result in a negative test result. 48-hour cultures should be used to maximise growth of the bacteria.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Microgen® Campylobacter has been evaluated as a culture confirmation test at two independent external centres and in-house. In total, 527 faecal specimens were cultured on selective agar plates for 48 hours and colonies tested by Microgen® Campylobacter.

		Microgen® Campylobacter		Total
		Positive	Negative	
Reference Methods	Positive	143	2	145
	Negative	1	381	382
Total		144	383	527

Sensitivity: 143/145 = 98.6%
Specificity: 381/382 = 99.7%

Efficiency: 524/527 = 99.4%

The specificity of Microgen® Campylobacter has been confirmed by testing a wide variety of cultured microorganisms:

Organism	Number of isolates	Microgen® Campylobacter		
		Pos	Neg	Non-specific reaction
<u>Thermophilic Campylobacters:</u>				
<i>C. jejuni</i>	37	37	0	0
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	3	3	0	0
<i>C. coli</i>	4	4	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	13	13	0	0
<i>C. laridis</i>	1	1	0	0
<i>C. fetus</i>	2	2	0	0
<u>Non-thermophilic campylobacters:</u>				
<i>C. concisus</i>	5	0	3	2 (weak)
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	3	0
<i>C. sputorum faecalis</i>	1	0	0	1 (weak)
<i>C. curvis</i>	2	0	2	0
<u>Closely related bacteria:</u>				
<i>Helicobacter pylori</i>	12	2 (weak)	10	0
<i>Helicobacter fennelliae</i>	5	0	5	0
<i>Helicobacter cinaedi</i>	4	2	2	0
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	0	4	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	1	0
<u>Other non-related bacteria:</u>				
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	1	0
<i>Providencia acalifaciens</i>	1	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	5	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2	0
<i>Citrobacter spp</i>	9	0	9	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0
♂ <i>Streptococcus</i>	2	0	2	0
♂ <i>Streptococcus</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella edwardsii</i>	1	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	3	0
<i>Salmonella spp</i>	11	0	11	0
<i>Salmonella</i> (Group B)	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> (Group C)	1	0	1	0
<i>Salmonella flexneri</i>	1	0	1	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio spp</i>	3	0	3	0
<i>Vibrio cholera</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter spp</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	1 (strong)
Yeast	1	0	1	0

All thermophilic Campylobacters tested were reactive with Microgen® Campylobacter. Non-thermophilic campylobacters were non-reactive although 3 of the 11 strains tested showed weak non-specific agglutination.

Of a group of closely related bacteria, 2 *Helicobacter pylori* isolates (of 12) were weakly reactive in the test and 2 isolates of *Helicobacter cinaedi* cross-reacted.

A wide range of other non-related bacteria was also tested. None were reactive in the test although one isolate of *Acinetobacter baumannii* exhibited strong non-specific agglutination.

REPRODUCIBILITY

Intra-batch reproducibility was established by testing sensitivity of 1 batch of product against serial dilutions of reference and kit positive control antigens on 3 separate occasions. End-point titres obtained with reference/control antigens were identical in the three assays.

Inter-batch reproducibility was examined by testing sensitivity of 3 batches of product against serial dilutions of reference and kit positive control antigens. No significant differences in end-point titres were seen across the three batches.

APPENDIX

Preparation of Blood-Free Selective Medium - Modified CCDA Preston

1. Dissolve 22.75g Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (Oxoid CM739) in 500mL distilled water by boiling.
2. Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.
3. Cool to 50°C, then add 1 vial Cefoperazone Selective Supplement (Oxoid SR125) aseptically.
4. Mix thoroughly and pour into sterile petri dishes (15-20mL/dish)

D

ZWECKBESTIMMUNG

Microgen® Campylobacter ist ein schneller Latexagglutinationstest, der zur bestätigenden Identifikation von enteropathogenen thermophilen Campylobacter-Erregern bestimmt ist, die auf ausgewählten festen Medien aus Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf bakterielle Enteritis kultiviert worden sind. Das Kit sollte nur von Fachpersonal zu Laborzwecken verwendet werden.

TESTPRINZIP

Latexpartikel werden mit Kaninchen-Immunglobulinen beschichtet, die gegen Antigenpräparate aus ausgewählten *Campylobacter jejuni* –Serotypen gezüchtet worden sind. Wenn die sensibilisierten Latexpartikel mit einer Lösung, die enteropathogene Campylobacter-Antigene enthält, gemischt werden, findet eine sensitive und spezifische Immunreaktion statt, die dazu führt, dass die fein verteilten Latexpartikel in Aggregate agglutinieren, die mit dem bloßen Auge leicht zu erkennen sind.

CONT

INHALT DES KITS

REAG

TEST

M46a Test-Latexreagenz: 2,5 ml

Latexpartikel behandelt mit Kaninchen-Antikörpern gegen Campylobacter -Antigene. Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Blauer** Verschluss)

REAG

CONTROL

M46b Kontroll-Latexreagenz: 2,5 ml

Latexpartikel behandelt mit unspezifischen Kaninchen-Immunglobulinen. Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Gelber** Verschluss)

CONTROL

+

M45c Positivkontrolle: 1,0 ml

Suspension inaktivierter Campylobacter-Antigene, die mit dem Test-Latexreagenz, jedoch nicht mit dem Kontroll-Latexreagenz reagieren. Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Schwarzer** Verschluss)

SAMP DIL

M46d Probenverdünnung: 50 ml

0.85% Kochsalzlösung konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Weißer** Verschluss)

Gebrauchsanweisung
Einwegobjektträger für die Agglutination
Einwegrührstäbchen

Zusätzlich werden benötigt:

- Bakterienösen
- Campylobacter-semiselektive feste Agarkulturplatten (siehe unten)
- Einwegkunststoffprobenröhrchen (Fassungsvermögen 1 ml)
- Gasgefäße zum Erhalt der mikroaerophilen Kulturbedingungen
- 42°C-Inkubator (falls nicht verfügbar, ist ein 37°C-Inkubator akzeptabel)

WARNHINWEISE UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Sicherheit:

1. Die Reagenzien in diesem Kit sind nur für die *In-vitro*-Diagnostik gedacht.
2. Natriumazid, das als Konservierungsmittel für die Reagenzien verwendet wird, kann mit in Abflussinstallationen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Anreicherung von explosiven Metallaziden führen. Bei Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um eine Anreicherung des Azids zu vermeiden.
3. Beim Umgang oder der Beseitigung von potenziellen Pathogenen sollten entsprechende Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden. Die Dekontamination infektiösen Materials kann mit Natriumhypochlorit bei einer Endkonzentration von 3 % über 30 Minuten erfolgen. Flüssige Abfallstoffe, die Säuren enthalten, müssen vor der Behandlung neutralisiert werden.
4. Die Positivkontrolle wurde während des Herstellungsprozesses inaktiviert. Trotzdem sollte dieses Produkt als potenziell infektiös behandelt werden.

Anwendung:

1. Microgen® Campylobacter sollte gemäß der Gebrauchsanweisung benutzt werden.
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung Raumtemperatur haben.
3. Keines der Reagenzien im Kit darf verdünnt werden.
4. Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht miteinander vermischt werden.
5. Keines der Reagenzien im Kit darf eingefroren werden.
6. Die Latexreagenzflasche sollte nicht mit der Positivkontrolle oder den Bakterienproben in Berührung kommen.
7. Vergewissern Sie sich, dass der Objektträger vor der Verwendung sauber und trocken ist.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Microgen® Campylobacter sollte bei Nichtverwendung bei 2-8°C gelagert werden. Das Kit darf nach dem Verfallsdatum auf dem Verpackungsetikett nicht mehr benutzt werden.

PROBEN

Sie Stuhlproben sollten auf den blutfreien selektiven Agarplatten (Modified CCDA Preston, siehe Anhang) mit einer Konzentration von 0,2-0,3g Probe pro Platte inokuliert werden. Die Platten müssen unter einer mikroaerophilen Atmosphäre 48 Stunden lang bei 42°C inkubiert werden. Kolonien mit einer Campylobacter-ähnlichen Morphologie werden zum Testen mit Microgen® Campylobacter entfernt (siehe unten).

VERFAHREN

Qualitätskontrolle:

Die folgende Prüfung mit der Positivkontrolle muss jedes Mal, wenn das Kit verwendet wird, durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Reagenzien richtig wirken:

1. Auf zwei benachbarte Bereiche auf dem Testträger muss ein einzelner 50µl-Tropfen Positivkontrolle gegeben werden.

2. Diese müssen, wie unten unter „Testverfahren“ beschrieben, mit den Test- und Kontroll-Latexreagenzien untersucht werden.
3. Reagenzien könnten unter folgenden Bedingungen verdorben sein:
 - Es tritt keine Reaktion zwischen dem Test-Latexreagenz und der Positivkontrolle auf ODER die Reaktion wird mit der Zeit beträchtlich schwächer.
 - Das Kontroll-Latexreagenz reagiert mit der Positivkontrolle.
 - Ein Latexreagenz verfärbt sich oder bildet Klumpen, die sich nicht durch sanftes Schütteln auflösen.

Testverfahren:

1. Alle Reagenzien Raumtemperatur erreichen lassen. Die Latexreagenzien sanft schütteln, um eine homogene Suspension zu gewährleisten.
2. 50µl der Probenverdünnung in jedes der beiden Ovale auf dem Agglutinationsobjektträger verteilen.
3. Eine Impföse zum Entfernen verschiedener Kolonien mit Campylobacter-ähnlicher Morphologie verwenden. Wenn die Anzeichen mikrobiellen Wachstums spärlich sind, breit über die Agaroberfläche streichen. Die Bakterien in jeden der beiden Tropfen Probenverdünnung auf dem Träger mischen, um gleichmäßige Suspensionen zu bilden.
4. 1 Tropfen (50µl) Kontroll-Latexreagenz in eine der bakteriellen Suspensionen auf dem Träger geben. Gleichermaßen 1 Tropfen (50µl) Test-Latexreagenz in die andere Bakteriensuspension geben.
5. Die Bakteriensuspensionen mit den Latexreagenzien mithilfe eines Rührstäbchens mischen. **Dabei mit dem Kontroll-Latexreagenz beginnen.** Die Mischungen bis an die Kanten der Ovalbereiche verteilen.
6. Den Träger 2 Minuten lang sanft schwenken, um die Flüssigkeitssuspensionen in ständiger Bewegung zu halten. Auf Agglutination achten.
7. Die Testergebnisse ablesen (siehe INTERPRETATION unten).
8. Die benutzten Rührstäbchen und Objektträger in geeigneter Desinfektionslösung entsorgen.

INTERPRETATION

Eine Agglutinationsreaktion wird durch eine sichtbare Aggregation der Latexpartikel angezeigt. Die Stärke der Reaktion kann schwanken, und kann gemäß der folgenden Richtlinien bewertet werden.

- | | | | |
|-----|----------|---|---|
| + | Reaktion | - | feine, leicht erkennbare Granularität vor einem milchigen Hintergrund |
| ++ | Reaktion | - | grobe Granularität vor einem milchigen Hintergrund. |
| +++ | Reaktion | - | schwere Verklumpung von Partikeln um die Peripherie des Testovals vor einem klaren Hintergrund. |

Die Ergebnisse von Microgen® Campylobacter sollten wie folgt interpretiert werden:

Reaktion mit Testlatex	Reaktion mit Kontrolllatex	Interpretation
+	-	Campylobacter-Erreger vorhanden
-	-	Campylobacter-Erreger nicht in ausreichender Zahl vorhanden, um von dem Test nachgewiesen zu werden
+	+	Nicht-spezifische Agglutination. Kein eindeutiges Ergebnis*

*Eine Probe, die zur Agglutination des Kontroll-Latexreagenzes führt, kann mit Microgen® Campylobacter nicht getestet werden.

ANWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN

1. Die Ergebnisse sollten durch den Arzt immer im Kontext aller vorhandenen klinischen und Laborparameter interpretiert werden.
2. Eine nicht-spezifische Agglutination schließt die Anwesenheit von Campylobacter-Erregern nicht aus, das Ergebnis muss aber

als nicht eindeutig berichtet werden. Die Probe muss mit einer alternativen Methode untersucht werden.

3. Sehr niedrige Zahlen von Campylobacter-Erregern können zu einem negativen Testergebnis führen. Zur Maximierung des Bakterienwachstums sollten 48-Stunden-Kulturen verwendet werden.

LEISTUNGSDATEN

Microgen® Campylobacter ist als Kulturbestätigungstest in zwei unabhängigen Zentren und intern bewertet worden. Insgesamt wurden 527 Stuhlproben 48 Stunden lang auf selektiven Agarplatten kultiviert und die Kolonien mit Microgen® Campylobacter getestet.

		Microgen® Campylobacter		Gesamt
		Positiv	Negativ	
Referenzmethoden	Positiv	143	2	145
	Negativ	1	381	382
Gesamt		144	383	527

Sensitivität: $143/145 = 98,6\%$

Spezifität: $381/382 = 99,7\%$

Effizienz: $524/527 = 99,4\%$

Die Spezifität von Microgen® Campylobacter wurde durch Untersuchung mit einer Vielzahl kultivierter Mikroorganismen bestätigt:

Organismus	Anzahl Isolate	Microgen® Campylobacter		
		Pos	Neg	Nicht-spezifische Reaktion
<u>Thermophile Campylobacter-Erreger:</u>				
<i>C. jejuni</i>	37	37	0	0
<i>C. jejuni</i> -Unterart <i>doylei</i>	3	3	0	0
<i>C. coli</i>	4	4	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	13	13	0	0
<i>C. laridis</i>	1	1	0	0
<i>C. fetus</i>	2	2	0	0
<u>Nicht-thermophile Campylobacter-Erreger:</u>				
<i>C. concisus</i>	5	0	3	2 (schwach)
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	3	0
<i>C. sputorum faecalis</i>	1	0	0	1 (schwach)
<i>C. curvis</i>	2	0	2	0
<u>Eng verwandte Bakterien:</u>				
<i>Helicobacter pylori</i>	12	2 (schwach)	10	0
<i>Helicobacter fennelliae</i>	5	0	5	0
<i>Helicobacter cinaedi</i>	4	2	2	0
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	0	4	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	1	0
<u>Andere eng verwandte Bakterien:</u>				
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	1	0
<i>Providencia acalifaciens</i>	1	0	1	0
<i>Escherichia. coli</i>	5	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2	0
<i>Citrobacter spp</i>	9	0	9	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0
♣ Streptococcus	2	0	2	0
ß Streptococcus	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella edwardsii</i>	1	0	1	0

<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	3	0
<i>Salmonella</i> spp	11	0	11	0
<i>Salmonella</i> (Groupe B)	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> (Groupe C)	1	0	1	0
<i>Salmonella flexneri</i>	1	0	1	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio</i> spp	3	0	3	0
<i>Vibrio cholera</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter</i> spp	1	0	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	1 (stark)
Hefe	1	0	1	0

Alle untersuchten thermophilen *Campylobacter*-Erreger reagierten mit Microgen® *Campylobacter*. Nicht-thermophile *Campylobacter*-Erreger reagierte nicht, obgleich 3 der 11 untersuchten Stämme eine schwache nicht-spezifische Agglutination zeigten.

Von einer Gruppe eng verwandter Bakterien, waren 2 *Helicobacter pylori*-Isolate (von 12) in dem Test schwach reaktiv und 2 Isolate von *Helicobacter cinaedi* zeigten Kreuzreaktionen.

Eine breite Auswahl anderer nicht verwandter Bakterien wurde ebenfalls untersucht. Keine reagierten in dem Test, obgleich ein Isolat von *Acinetobacter baumannii* eine starke nicht-spezifische Agglutination zeigte.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Intrachargenreproduzierbarkeit wurde durch Testen der Sensitivität und Spezifität von 1 Produktcharge im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe von Referenz- und Kit-Kontrollantigenen bei drei separaten Durchgängen untersucht. Die Endpunkttiter, die mit den Referenz-/Kontrollantigenen ermittelt wurden, waren in den drei Assays identisch.

Die Interchargenreproduzierbarkeit wurde durch Testen der Sensitivität von 3 Produktchargen im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe von Referenz- und Kit-Kontrollantigenen untersucht. Zwischen den drei Chargen wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Endpunkttitern festgestellt.

ANHANG

Herstellung blutfreien selektiven Mediums - Modified CCDA Preston

- 22,75g *Campylobacter* Blutfreie Selektive Agarbasis (Oxoid CM739) in 500ml destilliertem Wasser durch Kochen auflösen.
- Bei 121°C 15 Minuten im Autoklaven sterilisieren.
- Auf 50°C abkühlen, dann aseptisch 1 Fläschchen Cefoperazone Selektives Supplement (Oxoid SR125) hinzugeben.
- Gründlich und in sterile Petrischalen geben (15-20ml/Schale).

F

USAGE PREVU

Microgen® *Campylobacter* est un test d'agglutination rapide au latex conçu pour identifier avec certitude les *campylobacters* thermophiles entéropathogènes cultivés sur un support solide sélectif prélevé à partir d'échantillons fécaux de patients présentant une entérite bactérienne présumée. La trousse est uniquement destinée aux laboratoires.

PRINCIPE DU TEST

Les particules de latex sont enrobées d'immunoglobulines de lapin dirigées contre les préparations d'antigène provenant de sérotypes sélectionnés de *Campylobacter jejuni*. Lorsque les particules de latex sensibilisées sont mélangées à une solution contenant des antigènes de *campylobacter* entéropathogène, une réaction immunochimique sensible et spécifique se produit, amenant les particules de latex finement dispersées à s'agglutiner en agrégats facilement perceptibles à l'oeil nu.

CONT

PRESENTATION DE LA TROUSSE

REAG

TEST

M46a Réactif latex test : 2,5 ml

Particules de latex enrobées d'anticorps de lapin d'antigènes de *campylobacter*. Conservées avec de l'azide de sodium à 0,099 %. (capuchon **bleu**)

REAG

CONTROL

M46b Réactif latex de contrôle : 2,5 ml

Particules de latex enrobées d'immunoglobulines de lapin non spécifiques. Conservées avec de l'azide de sodium à 0,099 %. (capuchon **jaune**)

CONTROL

+

M46c Contrôle positif : 1,0 ml

Suspension d'antigènes de *campylobacter* inactivés réagissant au réactif latex test, mais ne réagissant pas au réactif latex de contrôle. Conservée avec de l'azide de sodium à 0,099 %. (capuchon **noir**)

SAMP DIL

M46d Diluant d'échantillon : 50 ml

Solution saline 0.85% conservée avec de l'azide de sodium à 0,099 %. (capuchon **blanc**)

Mode d'emploi

Lames d'agglutination jetables
Bâtonnets de mélange jetables

Matériels supplémentaires requis :

- Ôses bactériologiques
- Plaques de culture à la gélose solides semi-sélectives de *campylobacter* (voir plus bas)
- Tubes de spécimen en plastique jetables (capacité de 1 ml)
- Cuves de gaz permettant de maintenir des conditions de culture microaérophiles
- Incubateur à 42 °C (en cas d'indisponibilité, il est possible d'utiliser un incubateur à 37 °C)

AVERTISSEMENTS ET MESURES DE SECURITE

Mesures de sécurité :

1. Les réactifs fournis dans cette trousse sont destinés à une utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. L'azide de sodium, qui est utilisé en tant que conservateur dans les réactifs de la trousse, peut précipiter avec une tuyauterie en plomb ou en cuivre pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Éliminer en nettoyant à grande eau pour prévenir une accumulation d'azide.
3. Prendre toutes les mesures appropriées lors de la manipulation ou de l'élimination des pathogènes potentiels. Décontaminer les produits infectants avec une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration finale de 3 % pendant 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avant traitement.
4. Le contrôle positif a été inactivé lors du processus de fabrication. Il doit néanmoins être manipulé comme s'il était potentiellement infectieux.

Procédure :

1. Utiliser Microgen® *Campylobacter* conformément aux instructions de la trousse.

2. Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant utilisation.
3. Ne diluer aucun réactif de la trousse
4. Ne pas intervertir les réactifs de trousses de différents lots.
5. Ne congeler aucun réactif de la trousse
6. Ne pas laisser le compte-gouttes de réactif latex entrer en contact avec le contrôle positif ou les échantillons bactériens.
7. Vérifier que la lame d'agglutination est propre et sèche avant utilisation.

CONSERVATION ET DUREE DE CONSERVATION

Microgen® Campylobacter doit être conservé à 2-8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé. La trousse ne doit pas être utilisée après la date de péremption imprimée sur l'emballage.

SPECIMENS

Les échantillons fécaux doivent être inoculés sur des plaques de gélose sélectives exemptes de sang (CCDA Preston modifié, voir l'Annexe) à une concentration de 0,2-0,3 g d'échantillon par plaque. Les plaques doivent être incubées dans une atmosphère microaérophile à 42 °C pendant 48 heures. Les colonies dont la morphologie ressemble à celle du campylobacter ne sont pas testées avec Microgen® Campylobacter (voir plus bas)

MODE OPERATOIRE

Contrôle qualité :

Le contrôle suivant, qui s'applique au contrôle positif, doit être effectué à chaque utilisation de la trousse afin de confirmer que les réactifs fonctionnent correctement :

1. Une goutte de contrôle positif (50 µl) doit être versée sur deux zones voisines de la lame de test.
2. Ces zones doivent être testées avec les réactifs latex test et de contrôle, comme décrit dans la Procédure de test suivante.
3. Suspecter une détérioration d'un réactif si :
 - Aucune réaction n'est constatée entre le réactif latex test et le contrôle positif OU si la réaction indique une baisse significative de son titre avec le temps.
 - Le réactif latex de contrôle réagit au contrôle positif
 - Un réactif latex se décolore ou forme des grumeaux qui ne se dispersent pas après avoir été légèrement secoués.

Procédure de test :

1. Amener tous les réactifs à température ambiante. Secouer doucement les réactifs latex pour obtenir une suspension homogène.
2. Verser 50 µl de diluant d'échantillon sur chacun des deux ovales de la lame d'agglutination.
3. Utiliser une boucle inoculante pour retirer plusieurs colonies présentant une morphologie similaire à celle du campylobacter. Si la croissance microbienne n'apparaît pas clairement, balayer toute la surface de la gélose. Mélanger les bactéries dans chacune des deux gouttes de diluant d'échantillon sur la lame afin de former des suspensions régulières.
4. Ajouter 1 goutte (50 µl) de réactif latex de contrôle à l'une des suspensions bactériennes figurant sur la lame. De même, verser 1 goutte (50 µl) de réactif latex test dans l'autre suspension bactérienne.
5. Mélanger les suspensions bactériennes comprenant les réactifs latex avec un bâtonnet de mélange, en commençant par le réactif latex de contrôle. Etaler le mélange vers les bords des zones ovales.
6. Secouer doucement la lame pendant 2 minutes afin de garder les suspensions de fluide en mouvement. Rechercher une agglutination.
7. Lire les résultats du test (voir la section INTERPRETATION plus bas)
8. Jeter les bâtonnets de mélange et les lames usagés dans un désinfectant approprié.

INTERPRETATION

L'agglutination est indiquée par une agrégation visible des particules de latex. L'intensité de la réaction peut varier et être déterminée selon les critères suivants.

- | | | | |
|-----|----------|---|--|
| + | réaction | - | granularité fine, mais aisément perceptible sur un fond laiteux. |
| ++ | réaction | - | granularité grossière sur un fond laiteux. |
| +++ | réaction | - | groupement massif de particules autour de la périphérie de l'ovale test sur un fond clair. |

Les résultats Microgen® Campylobacter doivent être interprétés comme suit :

Réaction au réactif latex test	Réaction au réactif latex de contrôle	Interprétation
+	-	Présence de campylobacters
-	-	Campylobacters non présents en nombre suffisant pour pouvoir être détectés par le test
+	+	Agglutination non spécifique. Résultat peu concluant*

*Un spécimen qui entraîne l'agglutination du réactif latex de contrôle ne peut pas être testé avec le test Microgen® Campylobacter.

LIMITES D'UTILISATION

1. Les résultats doivent être interprétés par le médecin à la lumière des autres informations cliniques et de laboratoire disponibles.
2. Une agglutination non spécifique du réactif latex de contrôle n'exclut pas la présence de campylobacters, mais le résultat doit être rapporté comme étant peu concluant. L'échantillon doit être testé avec une autre méthode.
3. Des nombres très faibles de campylobacters peuvent entraîner un résultat de test négatif. Les cultures de 48 heures doivent être utilisées pour optimiser la croissance des bactéries.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Microgen® Campylobacter a été évalué en tant que test de confirmation en culture par deux établissements externes indépendants et en interne. Un total de 527 spécimens fécaux ont été cultivés sur des plaques de gélose sélectives pendant 48 heures et les colonies ont été testées avec le test Microgen® Campylobacter.

		Microgen® Campylobacter		Total
		Positif	Négatif	
Méthodes de référence	Positif	143	2	145
	Négatif	1	381	382
Total		144	383	527

Sensibilité : $143/145 = 98,6 \%$

Spécificité : $381/382 = 99,7 \%$

Efficacité : $524/527 = 99,4\%$

La spécificité du test Microgen® Campylobacter a été confirmée par des tests effectués sur une grande variété de micro-organismes cultivés :

Organisme	Nombre d'isolats	Microgen® Campylobacter		
		Pos	Nég	Réaction non spécifique
<u>Campylobacters thermophiles :</u>				
<i>C. jejuni</i>	37	37	0	0
<i>C. jejuni</i> subsp.	3	3	0	0

doylei				
<i>C. coli</i>	4	4	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	13	13	0	0
<i>C. laridis</i>	1	1	0	0
<i>C. fetus</i>	2	2	0	0
<u>Campylobacters non thermophiles :</u>				
<i>C. concisus</i>	5	0	3	2 (faible)
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	3	0
<i>C. sputorum faecalis</i>	1	0	0	1 (faible)
<i>C. curvis</i>	2	0	2	0
<u>Bactéries étroitement liées :</u>				
<i>Helicobacter pylori</i>	12	2 (faible)	10	0
<i>Helicobacter fennelliae</i>	5	0	5	0
<i>Helicobacter cinaedi</i>	4	2	2	0
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	0	4	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	1	0
<u>Autres bactéries non liées :</u>				
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	1	0
<i>Providencia acalifaciens</i>	1	0	1	0
<i>Escherichia. coli</i>	5	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2	0
<i>Citrobacter spp</i>	9	0	9	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0
♣ <i>Streptococcus</i>	2	0	2	0
β <i>Streptococcus</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella edwardsii</i>	1	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	3	0
<i>Salmonella spp</i>	11	0	11	0
<i>Salmonella</i> (Groupe B)	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> (Groupe C)	1	0	1	0
<i>Salmonella flexneri</i>	1	0	1	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio spp</i>	3	0	3	0
<i>Vibrio cholera</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio</i>	1	0	1	0
<i>parahaemolyticus</i>				
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter spp</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	1 (fort)
<i>Levure</i>	1	0	1	0

Tous les campylobacters thermophiles testés ont réagi au test Microgen® Campylobacter. Les campylobacters non thermophiles n'ont pas réagi, bien que 3 des 11 souches testées aient montré une faible agglutination non spécifique.

Sur un groupe de bactéries étroitement liées, 2 isolats de *Helicobacter pylori* (sur 12) ont montré une faible réaction au test et 2 isolats de *Helicobacter cinaedi* ont présenté une réaction croisée.

Une vaste plage d'autres bactéries non liées a également été testée. Aucune n'a réagi au test, bien qu'un isolat de *Acinetobacter baumannii* ait présenté une forte agglutination non spécifique.

REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité intra-lots a été déterminée en testant la sensibilité d'1 lot de produit par rapport à des dilutions en série d'antigènes de contrôle positif de la trousse et de référence à 3 moments séparés. Les titres de référence obtenus avec les antigènes de référence/de contrôle se sont révélés identiques dans les trois dosages.

La reproductibilité inter-lots a été examinée en testant la sensibilité de 3 lots de produit par rapport à des dilutions en série d'antigènes de contrôle positif de la trousse et de référence. Aucune différence significative n'a été constatée entre les trois lots au niveau des titres de référence.

ANNEXE

Préparation d'un milieu sélectif exempt de sang - CCDA Preston modifié

1. Dissoudre en menant à ébullition 22,75 g de base de gélose sélective exempte de sang de campylobacter (Oxoid CM739) dans 500 ml d'eau distillée.
2. Stériliser par autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
3. Laisser refroidir à 50 °C, puis ajouter 1 flacon de supplément sélectif de Cefoperazone (Oxoid SR125) selon une technique aseptique.
4. Mélanger vigoureusement et verser dans des boîtes de Petri stériles (15 à 20 ml/boîte)

E

INDICACIONES DE USO

Microgen® Campylobacter es una prueba rápida de aglutinación en látex, indicada para la identificación confirmatoria de *Campylobacter* enteropatógenos y termofílicos, cultivados en medios sólidos selectivos de muestras fecales de pacientes en los que se sospecha enteritis bacteriana. El kit está indicado únicamente para uso en laboratorios profesionales.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las partículas de látex están recubiertas con inmunoglobulinas de conejo formadas contra preparaciones de antígeno a partir de de serotipos seleccionados de *Campylobacter jejuni*.

Cuando las partículas de látex sensibilizadas se mezclan con una solución que contiene antígeno de *Campylobacter* enteropatógeno, se produce una reacción inmunoquímica sensible y específica, que hace que las partículas de látex finalmente dispersas se aglutinen rápidamente en agregados que son fácilmente visibles a simple vista.

CONT

PRESENTACIÓN DEL KIT

REAG

TEST

M46a Reactivo de látex de prueba: 2,5 ml

Las partículas de látex están recubiertas con anticuerpos de conejo dirigidos contra los antígenos de *Campylobacter*. Conservado con azida sódica al 0,099%. (Tapón **azul**)

REAG

CONTROL

M46b Reactivo de látex de control: 2,5 ml

Las partículas de látex están recubiertas con inmunoglobulinas de conejo no específicas. Conservado con azida sódica al 0,099%. (Tapón **amarillo**)

CONTROL

+

M46c Control positivo: 1,0 ml

Suspensión de antígenos de *Campylobacter* inactivados, reactivos con el reactivo de látex de prueba y no reactivos con el reactivo de látex de control. Conservado con azida sódica al 0,099%. (Tapón **negro**)

SAMP DIL

M46d Diluyente de la muestra: 50 ml

0.85% Solución salina conservada con azida sódica al 0,099%. (Tapón **blanco**)

Instrucciones de uso
Láminas de aglutinación desechables
Varillas para mezclar desechables

Requisitos adicionales:

- Asas bacteriológicas
- Placas de cultivo de agar sólido semiselectivas para *Campylobacter* (ver más adelante)
- Tubos para muestras de plástico desechables (capacidad, 1 ml)
- Recipientes de gas para mantener las condiciones microaerófilas del cultivo
- Incubadora a 41 °C (si no se dispone de ésta, una incubadora a 37 °C es aceptable)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Seguridad:

1. Los reactivos suministrados en este kit son sólo para uso diagnóstico *in vitro*.
2. La azida sódica, que se emplea como conservante en los reactivos del kit, puede reaccionar con las cañerías de plomo o cobre, para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Elimine aclarando con un gran volumen de agua, para evitar la acumulación de azidas.
3. Al manipular o eliminar elementos potencialmente patógenos se deberán tomar precauciones especiales. La descontaminación del material infeccioso se puede obtener con hipoclorito de sodio a una concentración final del 3% durante 30 minutos. Los desechos líquidos que contienen ácido se deben neutralizar antes del tratamiento.
4. El control positivo se ha inactivado durante el proceso de fabricación. Sin embargo, se deberá manipular como si fuera potencialmente infeccioso.

Procedimiento:

1. Microgen® *Campylobacter* se deberá utilizar según las instrucciones del kit.
2. Espere que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
3. No diluya ninguno de los reactivos del kit.
4. No mezcle entre sí los reactivos de diferentes lotes del kit.
5. No congele ninguno de los reactivos del kit.
6. No deje que el gotero del reactivo de látex toque el control positivo ni las muestras bacterianas.
7. Asegúrese de que la lámina de aglutinación esté limpia y seca antes de su uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Microgen® *Campylobacter* se deberá almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C cuando no se utilice. El kit no se deberá usar después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja.

MUESTRAS

Las muestras fecales se deberán inocular en placas de agar selectivo y desprovisto de sangre (CCDA Preston modificado; consulte el apéndice), a una concentración de 0,2 a 0,3 g de muestra por placa. Las placas se deberán incubar en una atmósfera microaerófila a 42 °C, durante 48 horas.

Las colonias con morfología similar a la de *Campylobacter* se eliminan para analizar con Microgen® *Campylobacter* (vea más adelante).

PROCEDIMIENTO

Control de calidad:

Cada vez que se utilice el kit, se deberán hacer la siguiente comprobación con el control positivo, para confirmar que los reactivos funcionan correctamente:

1. Se deberá colocar una sola gota de 50 µl de control positivo en dos zonas adyacentes de la lámina de prueba.

2. Éstas se deberán analizar con los reactivos de látex de prueba y de control, tal como se describe en "Procedimiento de la prueba", más adelante.
3. Se deberá sospechar el deterioro de un reactivo si:
 - No existe reacción entre el reactivo de látex de prueba y el control positivo, o si la reacción muestra una pérdida significativa de intensidad con el tiempo.
 - El reactivo de látex de control reacciona con el control positivo.
 - Un reactivo de látex se decolora o forma grumos que no se dispersan al agitar con cuidado.

Procedimiento de la prueba:

1. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente. Agite con cuidado los reactivos de látex para asegurar una suspensión homogénea.
2. Coloque 50 µl de diluyente de la muestra en cada uno de dos óvalos de la lámina de aglutinación.
3. Utilice un asa de inoculación para eliminar varias colonias con morfología similar a la de *Campylobacter*. Si hay pocos indicios de crecimiento microbiano, efectúe un barrido amplio de la superficie de agar. Mezcle en la lámina las bacterias de cada una de las dos gotas de diluyente de la muestra, para formar suspensiones uniformes.
4. Añada una gota (50 µl) de reactivo de látex de control a una de las suspensiones bacterianas de la lámina. De manera similar, coloque una gota (50 µl) de reactivo de látex de prueba en la otra suspensión bacteriana.
5. Mezcle las suspensiones bacterianas con los reactivos de látex, usando una varilla para mezclar, **comenzando con el reactivo de látex de control**. Esparza las mezclas hacia los bordes de las zonas ovaladas.
6. Balancee con cuidado la lámina, para mantener las suspensiones de líquido en movimiento constante, durante dos minutos. Observe la presencia de aglutinación.
7. Lea los resultados de la prueba (vea Interpretación, más adelante).
8. Deseche las varillas para mezclar y las láminas usadas, con un desinfectante adecuado.

INTERPRETACIÓN

Cualquier reacción de aglutinación es indicada por la agregación visible de las partículas de látex. La intensidad de la reacción puede variar y se puede evaluar según las siguientes pautas.

reacción + :	granularidad fina pero fácilmente discernible contra un fondo lechoso.
reacción ++ :	granularidad gruesa contra un fondo lechoso.
reacción +++ :	grumos grandes de partículas alrededor de la periferia del óvalo de prueba, contra un fondo claro.

Los resultados de Microgen® *Campylobacter* se deberán interpretar tal como se indica a continuación:

Reacción con látex de prueba	Reacción con látex de control	Interpretación
+	-	<i>Campylobacter</i> presente
-	-	<i>Campylobacter</i> no presente en cantidad suficiente para ser detectado por la prueba
+	+	Aglutinación no específica. Resultado no concluyente*

* Una muestra que produce la aglutinación del reactivo de látex de control no se puede analizar con Microgen® *Campylobacter*.

LIMITACIONES DE USO

1. Los resultados deberán ser interpretados por el clínico en el contexto de toda la información clínica y de laboratorio.
2. La aglutinación no específica del reactivo de látex de control no descarta la presencia de *Campylobacter*, pero el resultado se debe informar como no concluyente. La muestra deberá ser analizada mediante otro método.
3. Una cantidad muy baja de *Campylobacter* puede dar un resultado negativo. Para aumentar al máximo el crecimiento de las bacterias se deberán usar cultivos de 48 horas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se ha evaluado Microgen® *Campylobacter* como prueba de confirmación de cultivo, tanto en dos centros externos independientes como internamente. En total, se cultivaron 527 muestras de heces en placas de agar selectivo, durante 48 horas, y las colonias se analizaron mediante Microgen® *Campylobacter*

		Microgen® <i>Campylobacter</i>		Total
		Positivas	Negativas	
Métodos de referencia	Positivas	143	2	145
	Negativas	1	381	382
Total		144	383	527

Sensibilidad: 143/145 = 98,6%

Especificidad: 381/382 = 99,7%

Eficacia: 524/527 = 99,4%

Se ha confirmado de la especificidad de Microgen® *Campylobacter* mediante el análisis de una gran variedad de microorganismos cultivados:

Microorganismo	Número de aislados	Microgen® <i>Campylobacter</i>		
		Pos	Neg	Reacción no específica
<u><i>Campylobacter</i> termofilos:</u>				
<i>C. jejuni</i>	37	37	0	0
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	3	3	0	0
<i>C. coli</i>	4	4	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	13	13	0	0
<i>C. laridis</i>	1	1	0	0
<i>C. fetus</i>	2	2	0	0
<u><i>Campylobacter</i> no termofilos:</u>				
<i>C. concisus</i>	5	0	3	2 (débil)
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	3	0
<i>C. sputorum faecalis</i>	1	0	0	1 (débil)
<i>C. curvis</i>	2	0	2	0
<u>Bacterias estrechamente relacionadas:</u>				
<i>Helicobacter pylori</i>	12	2 (débil)	10	0
<i>Helicobacter fennelliae</i>	5	0	5	0
<i>Helicobacter cinaedi</i>	4	2	2	0
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	0	4	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	1	0
<u>Otras bacterias no relacionadas:</u>				
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	1	0
<i>Providencia acalifaciens</i>	1	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	5	0	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	2	0
<i>Citrobacter spp</i>	9	0	9	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0
<i>Streptococcus</i>	2	0	2	0

<i>Streptococcus</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella edwardsii</i>	1	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	3	0
<i>Salmonella</i> spp	11	0	11	0
<i>Salmonella</i> (grupo B)	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> (grupo C)	1	0	1	0
<i>Salmonella flexneri</i>	1	0	1	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio</i> spp	3	0	3	0
<i>Vibrio cholera</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter</i> spp	1	0	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	1 (fuerte)
Levadura	1	0	1	0

Todas las *Campylobacter* termofilas examinadas fueron reactivas con Microgen® *Campylobacter*. Las *Campylobacter* no termofilas fueron no reactivas, aunque 3 de las 11 cepas examinadas mostraron una aglutinación no específica débil.

De un grupo de bacterias estrechamente relacionadas, dos aislados de *Helicobacter pylori* (de 12) fueron débilmente reactivos con la prueba y 12 aislados de *Helicobacter cinaedi* presentaron reacción cruzada.

Se examinó también una amplia variedad de bacterias no relacionadas. Ninguna fue reactiva con la prueba, aunque un aislado de *Acinetobacter baumannii* presentó una aglutinación no específica intensa.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad intralote se estableció examinando la sensibilidad de un lote de producto contra diluciones seriadas de antígenos de referencia y de control positivo del kit, en tres ocasiones distintas. Los títulos de valoración obtenidos con los antígenos de referencia y de control fueron idénticos en los tres análisis.

La reproducibilidad entre lotes se estableció examinando la sensibilidad de tres lotes de producto contra diluciones seriadas de antígenos de referencia y de control positivo del kit. No se observó ninguna diferencia significativa en los títulos de valoración entre los tres lotes.

APÉNDICE

Preparación de medio selectivo sin sangre: CCDA Preston modificado

1. Disuelva 22,75 g de base de agar selectivo sin sangre *Campylobacter* (Oxoid CM739) en 500 ml de agua destilada, mediante ebullición.
2. Esterilice mediante autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.
3. Enfríe a 50 °C; a continuación, añada, en condiciones asépticas, un vial de suplemento selectivo de cefoperazona (Oxoid SR125).
4. Mezcle bien y vierta en placas petri estériles (15 a 20 ml por placa).

Microgen® Campylobacter è un test rapido di agglutinazione al lattice previsto per l'identificazione confermativa di campilobatteri termofili enteropatogeni messi in coltura su mezzi solidi selettivi da campioni fecali di pazienti con sospetta enterite batterica. Il kit è solo per uso professionale in laboratorio.

PRINCIPIO DEL TEST

Le particelle di lattice sono rivestite di immunoglobuline di coniglio dirette verso preparazioni antigeniche derivate da sierotipi selezionati di *Campylobacter jejuni*. Quando le particelle di lattice sensibilizzate vengono miscelate con una soluzione contenente antigeni di *Campylobacter enteropatogeni*, si verifica una reazione immunochimica sensibile e specifica che provoca l'agglutinazione delle particelle di lattice finemente disperse in aggregati facilmente visibili a occhio nudo.

CONT		PRESENTAZIONE DEL KIT
REAG	TEST	M46a Reagente al Lattice per il Test 2,5 ml

Particelle di lattice rivestite di anticorpi di coniglio contro antigeni di *Campylobacter*. Con 0,099% di azide sodica come conservante. (Tappo blu)

REAG	CONTROL	M46b Reagente al Lattice di Controllo 2,5 ml
------	---------	---

Particelle di lattice rivestite di immunoglobuline di coniglio non specifiche. Con 0,099% di azide sodica come conservante. (Tappo giallo)

CONTROL	+	M46c Controllo Positivo: 1,0 ml
---------	---	---------------------------------

Sospensione di antigeni inattivati di *Campylobacter* reattiva con il Reagente al Lattice per il Test e non reattiva con il Reagente al Lattice di Controllo. Con 0,099% di azide sodica come conservante. (Tappo nero)

SAMP	DIL	M46d Diluente del Campione: 50 ml
------	-----	-----------------------------------

Soluzione salina 0.85% conservata con 0,099% di azide sodica. (Tappo bianco)

Istruzioni per l'Uso
Vetrini per agglutinazione monouso
Bacchette per miscelazione monouso

Ulteriore materiale necessario:

- Anse batteriologiche
- Piastre di coltura di agar solido semiselettive per *Campylobacter* (vedere sotto)
- Provette di plastica monouso per i campioni (capacità 1 ml)
- Giare ermetiche per il mantenimento di condizioni di coltura microaerofile
- Incubatrice a 42°C (se non disponibile, è accettabile un'incubatrice a 37°C)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Sicurezza:

- I reagenti forniti nel kit sono esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*
- L'azide sodica, utilizzata come conservante nei reagenti del kit può reagire con le tubature in piombo o in rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Smaltire sciaccando abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di azidi
- Prendere le precauzioni del caso quando si manipolano o si smaltiscono potenziali patogeni. Per la decontaminazione del materiale infetto utilizzare ipoclorito di sodio a una concentrazione finale del 3% per 30 minuti. Gli scarti liquidi contenenti acido devono essere neutralizzati prima di trattarli

- Il controllo positivo è stato inattivato durante il processo di fabbricazione. In ogni caso deve essere manipolato come se fosse potenzialmente infetto

Procedurali:

- Utilizzare Microgen® Campylobacter in conformità alle istruzioni del kit
- Attendere che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso
- Non diluire i reagenti del kit
- Non scambiare tra loro reagenti provenienti da kit di lotti diversi
- Non congelare i reagenti del kit
- Fare in modo che il contagocce del reagente al lattice non tocchi il controllo positivo o i campioni batterici
- Assicurarsi che il vetrino per agglutinazione sia pulito e asciutto prima dell'uso

CONSERVAZIONE E PERIODO DI VALIDITA'

Conservare Microgen® Campylobacter a 2-8°C quando non viene utilizzato. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza stampata sull'etichetta del contenitore.

CAMPIONI

Inoculare i campioni fecali sulle piastre di agar selettive prive di sangue (CCDA Preston modificate, vedere l'Appendice) alla concentrazione di 0,2-0,3 g di campione per piastra. Incubare le piastre in atmosfera microaerofila a 42°C per 48 ore. Le colonie morfologicamente assomiglianti a *Campylobacter* vengono rimosse per esaminarle con Microgen® Campylobacter (vedere sotto).

PROCEDURA

Controllo di Qualità:

Ogni volta che si usa il kit si deve eseguire la seguente verifica con il Controllo Positivo per avere la conferma del corretto funzionamento dei reagenti:

- Dispensare una singola goccia da 50 µl di Controllo Positivo su due zone adiacenti del vetrino per il test
- Esaminare con i Reagenti al Lattice per il Test e di Controllo come descritto nella "Procedura del test" qui sotto
- Si deve sospettare il deterioramento di un reagente se:
 - Non avviene alcuna reazione tra il Reagente al Lattice per il Test e il Controllo Positivo OPPURE la reazione mostra una notevole perdita di intensità nel tempo
 - Il Reagente al Lattice di Controllo reagisce con il Controllo Positivo
 - Un reagente al lattice sbiadisce o forma dei grumi che non si disperdono agitando delicatamente

Procedura del test:

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente. Agitare delicatamente i reagenti al lattice per garantire che la sospensione sia omogenea
- Dispensare 50 µl di Diluente del Campione su ciascuno dei due ovali del vetrino di agglutinazione
- Utilizzare un'ansa da inoculo per rimuovere diverse colonie morfologicamente simili a *Campylobacter*. Se i segni della crescita microbica sono sparsi, raccogliere un ampio tratto della superficie dell'agar. Miscelare i batteri in ciascuna delle due gocce di Diluente del Campione sul vetrino per formare sospensioni omogenee
- Aggiungere 1 goccia (50 µl) di Reagente al Lattice di Controllo a una delle sospensioni batteriche sul vetrino. Allo stesso modo aggiungere 1 goccia (50 µl) di Reagente al Lattice per il Test all'altra sospensione batterica
- Miscelare le sospensioni batteriche con i reagenti al lattice utilizzando una bacchetta per miscelazione, **iniziando con il Reagente al Lattice di Controllo**. Spargere le miscele ai margini delle zone ovali
- Ruotare delicatamente il vetrino, per mantenere costantemente in movimento le sospensioni liquide, per 2 minuti. Osservare alla ricerca dell'agglutinazione
- Leggere i risultati del test. (vedere sotto INTERPRETAZIONE)

8. Eliminare le bacchette per miscelazione e i vetrini usati in un disinfettante adatto

INTERPRETAZIONE

L'aggregazione visibile delle particelle di lattice indica una reazione di agglutinazione. L'intensità della reazione può variare e può essere valutata in base alle seguenti linee guida.

- reazione + - granularità fine, ma ben visibile, su uno sfondo lattescente
 reazione ++ - granularità grossolana su uno sfondo lattescente
 reazione +++ - pesanti agglomerati di particelle attorno alla periferia dell'ovale del test, su uno sfondo trasparente

I risultati di Microgen® Campylobacter devono essere così interpretati:

Reazione con il Lattice per il Test	Reazione con il Lattice di Controllo	Interpretazione
+	-	Presenza di campilobatteri
-	-	Campilobatteri presenti in numero insufficiente per essere individuati dal test
+	+	Agglutinazione non specifica Risultato non decisivo*

*Un campione che provoca l'agglutinazione del Reagente al Lattice di Controllo non può essere testato con il Microgen® Campylobacter.

LIMITAZIONI D'USO

- I risultati devono essere interpretati dallo specialista nel contesto di tutte le informazioni disponibili, cliniche e di laboratorio
- L'agglutinazione non specifica del Reagente al Lattice di Controllo non preclude la presenza di campilobatteri ma il risultato deve essere registrato come non decisivo. Il campione deve essere testato con un metodo alternativo
- Un numero molto ridotto di campilobatteri può dar luogo a un risultato negativo del test. Per massimizzare la crescita batterica tenere in coltura per 48 ore

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Microgen® Campylobacter è stato valutato come test colturale di conferma in due centri indipendenti esterni e internamente. In totale 527 campioni fecali sono stati messi in coltura su piastre di agar selettive per 48 ore e sottoposti al test con Microgen® Campylobacter.

		Microgen® Campylobacter		Totale
		Positivo	Negativo	
Metodi di riferimento	Positivo	143	2	145
	Negativo	1	381	382
Totale		144	383	527

Sensibilità: 143/145 = 98,6%
 Specificità: 381/382 = 99,7%
 Efficienza: 524/527 = 99,4%

La specificità di Microgen® Campylobacter è stata confermata sottoponendo al test una vasta gamma di microrganismi messi in coltura:

	di isolati	Pos	Neg	Reazione non specifica
<u>Campilobatteri termofili:</u>				
<i>C. jejuni</i>	37	37	0	0
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	3	3	0	0
<i>C. coli</i>	4	4	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	13	13	0	0
<i>C. laridis</i>	1	1	0	0
<i>C. fetus</i>	2	2	0	0
<u>Campilobatteri non termofili:</u>				
<i>C. concisus</i>	5	0	3	2 (debole)
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	3	0
<i>C. sputorum faecalis</i>	1	0	0	1 (debole)
<i>C. curvis</i>	2	0	2	0
<u>Batteri strettamente correlati:</u>				
<i>Helicobacter pylori</i>	12	2 (debole)	10	0
<i>Helicobacter fennelliae</i>	5	0	5	0
<i>Helicobacter cinaedi</i>	4	2	2	0
<i>Arcobacter butzleri</i>	4	0	4	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	1	0
<u>Altri batteri non correlati:</u>				
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	1	0
<i>Providencia</i>	1	0	1	0
<i>acalifaciens</i>				
<i>Escherichia coli</i>	5	0	5	0
<i>Pseudomonas</i>	2	0	2	0
<i>aeruginosa</i>				
<i>Citrobacter spp</i>	9	0	9	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0
♣ <i>Streptococco</i>	2	0	2	0
<i>Streptococco</i> β	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	0
<i>Klebsiella edwardsii</i>	1	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	3	0
<i>Salmonella</i> spp	11	0	11	0
<i>Salmonella</i> (Gruppo B)	1	0	1	0
<i>Salmonella</i> (Gruppo C)	1	0	1	0
<i>Salmonella flexneri</i>	1	0	1	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	1	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium difficile</i>	1	0	1	0
<i>Vibroni</i> spp	3	0	3	0
<i>Vibrio cholera</i>	1	0	1	0
<i>Vibrio</i>	1	0	1	0
<i>parahaemolyticus</i>				
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	1	0
<i>Acinetobacter</i> spp	1	0	1	0
<i>Acinetobacter baumanii</i>	1	0	0	1 (forte)
Lievito	1	0	1	0

Tutti i campilobatteri termofili sottoposti al test sono risultati reattivi a Microgen® Campylobacter. I campilobatteri non termofili sono risultati non reattivi anche se 3 degli 11 ceppi testati hanno mostrato una debole agglutinazione non specifica.

Di un gruppo di batteri strettamente correlati, 2 isolati (su 12) di *Helicobacter pylori* sono risultati debolmente reattivi nel test e 2 isolati di *Helicobacter cinaedi* hanno provocato una reazione crociata. Inoltre è stata sottoposta al test un'ampia gamma di altri batteri non correlati. Nessuno è risultato reattivo nel test, benché un isolato di *Acinetobacter baumanii* abbia mostrato una forte agglutinazione non specifica.

Organismo	Numero	Microgen® Campylobacter
-----------	--------	-------------------------

RIPRODUCIBILITA'

La riproducibilità intra-lotto è stata accertata analizzando la sensibilità di un lotto contro diluizioni seriali di antigeni di riferimento e di antigeni del controllo positivo del kit in 3 diverse occasioni. Il punto finale delle titolazioni ottenute con gli antigeni di riferimento/controllo è risultato identico nelle tre prove.

La riproducibilità inter-lotti è stata esaminata analizzando la sensibilità di 3 lotti di prodotto contro diluizioni seriali di antigeni di riferimento e di antigeni del controllo positivo del kit. Non sono state osservate differenze significative del punto finale delle titolazioni fra i tre lotti.

APPENDICE

Preparazione di un mezzo selettivo privo di sangue – CCDA Preston modificato

1. Sciogliere 22,75 g di base di agar selettivo privo di sangue per *Campylobacter* (Oxoid CM739) in 500 ml di acqua distillata facendola bollire
2. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti
3. Raffreddare a 50°C, quindi aggiungere 1 fiala di Cefoperazone come Supplemento selettivo (Oxoid SR 125) in condizioni di asepsi
4. Miscelare accuratamente e versare in capsule di Petri sterili (15-20 ml/capsula)



Microgen Bioproducts Ltd
1, Admiralty way
Camberley
Surrey, GU15 3DT, UK

WF2864/2006/04